

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09201

研究課題名(和文) 気管支肺胞洗浄液を用いた肺リンパ腫・リンパ増殖性疾患の分子生物学的診断

研究課題名(英文) The utility of the analyses of bronchoalveolar lavage fluid by molecular biological method for the diagnosis of pulmonary lymphomas.

研究代表者

城戸 貴志 (KIDO, Takashi)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30389465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本検討では、気管支肺胞洗浄液を用いたMALT1遺伝子転座、IgH及びTRBの再構成の同時検出を行い、肺リンパ腫診断における有用性を検討した。肺MALTリンパ腫に対してMALT1遺伝子転座は感度60%、偽陽性率0%であり、IgHの再構成は、肺MALTリンパ腫に対して感度90%、他の肺B細胞性悪性リンパ腫に対して感度75%であった。TRBの再構成においては、非リンパ腫での陽性例が57%と偽陽性率が非常に高かった。以上より、気管支肺胞洗浄液を用いたMALT1遺伝子転座およびIgHの再構成の同時検出が、肺リンパ腫診断に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have detected MALT1, IgH and TRB rearrangements in bronchoalveolar lavage fluid and investigated the utility for the diagnosis of pulmonary lymphomas. The sensitivity and false positive rate of MALT1 gene rearrangements for mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma was 60 and 0 %, respectively. The sensitivity of IgH gene rearrangements for MALT lymphoma and other B cell lymphomas was 90 and 88 %, respectively. TRB gene rearrangements were positive in many cases of non-lymphomas (57%).

These results suggest that detection of MALT1 and IgH gene rearrangements in bronchoalveolar lavage fluid are useful for the diagnosis of lung lymphomas.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺リンパ腫 肺MALTリンパ腫 肺リンパ増殖性疾患 MALT1遺伝子転座 IgH再構成 TRB再構成 気管支肺胞洗浄

1. 研究開始当初の背景

リンパ増殖性疾患の中で肺リンパ腫は、B細胞性の Mucosa-associated lymphoid tissues of bronchus lymphoma (以下、MALT リンパ腫) が多くを占めるが、その他の種々のリンパ腫も発症しうる。肺リンパ腫の診断上の問題点として、気管支鏡下での経気管支肺生検 (Transbronchial lung biopsy ; TBLB) によって得られる小組織 (TBLB 検体) では組織学的診断が困難なことが多く、これまでの報告では約 7 割で診断の為に外科的生検を受けたと報告されている。しかし、治療においては、外科的治療適応は約 3 割と限られていることや、外科的切除は予後に影響しないという報告もあり (Oh SY et al, Ann Hematol 2010)、侵襲性がより低い診断方法の確立が望まれる。我々は 2012 年に、気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 中の細胞を用いた Fluorescence in situ Hybridization (FISH) 法による *MALT lymphoma translocation gene 1 (MALT1)* 遺伝子転座検出は、診断への感度や特異性が高く外科的生検回避が可能であることから、有用であると報告した (Kido et al, CHEST 2012)。2013 年度からは、さらなる診断感度の向上や他疾患診断へも応用可能と考え、他の遺伝子変異検出や clonality の検出を含め

た新たな検討を開始した。

2. 研究の目的

BALF を用いた *MALT1* 遺伝子変異や IgH、TCR 遺伝子再構成の同時検出による肺リンパ腫の分子生物学的診断方法の有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

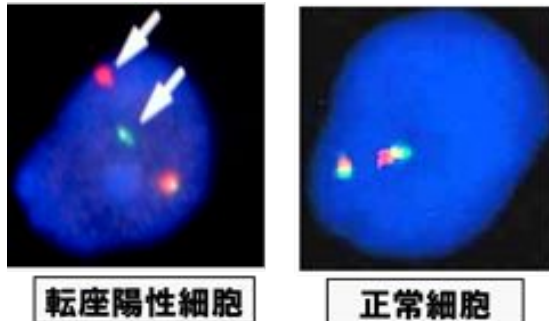
主要評価項目：各肺リンパ腫、肺リンパ増殖性疾患診断における有用性 (感度、診断精度)
対象患者：肺リンパ腫及びリンパ増殖性疾患が疑われ、診断に気管支肺胞洗浄が有用と考えられた症例。

研究方法：多施設共同前向き研究

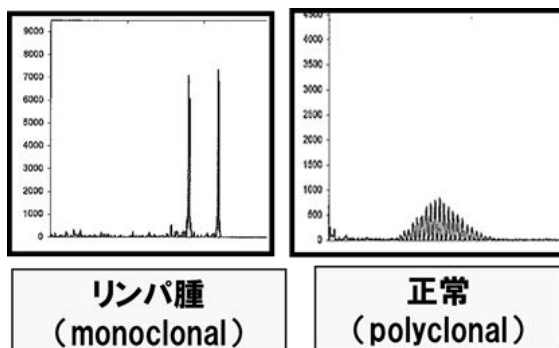
方法：通常の方法で気管支鏡検査を行い、残余した BALF を用いて *MALT1* 遺伝子転座と PCR 法による IgH の再構成および TRB の再構成の同時検出を行った。

(a) *MALT1* 遺伝子転座検出：18q21 (*MALT1*) 遺伝子の両側を、一つ目のプローブは 460 kb で *MALT1* 遺伝子の 5' サイドをオレンジにラベルする。二つ目のプローブは 660 kb で *MALT1* 遺伝子の 3' サイドを緑にラベルした。通常では赤と緑の融合が観察されるが、転座があると赤と緑のシグナルがそれぞれ単独で発色することとなる。リンパ球は 200 個以

上カウントされ、スプリットシグナルが全リンパ球の3%以上陽性の場合、*MALT1* 遺伝子転座陽性と判定した。



(b) IgH と TCR 遺伝子再構成の検出: In vivo scribe Technologies 社の Assay kit を用いて、PCR 法にて行った。IgH 遺伝子においては可変領域 (VH) ~ 結合領域 (JH) 及び、Diversity 領域 (DH) ~ 結合領域 (JH) に含まれる保存領域をターゲットとし、TCR 遺伝子 (鎖) は可変領域 (V) 多様性領域 (V) 結合領域 (J) に含まれる保存領域をターゲットとしたプライマーが含まれており、同領域を PCR 法で増幅し、モノクローナルなパターンであれば陽性とした。



参加施設：産業医科大学、産業医科大学若松

病院、長崎大学、福岡大学、大分大学、宮崎大学、九州労災病院、小倉記念病院、北九州総合病院

4. 研究成果

(1) 参加施設別症例登録数

施設	症例数
産業医科大学	25
長崎大学	9
福岡大学	6
小倉記念病院	4
九州労災病院	3
産業医科大学若松病院	2
大分大学	2
宮崎大学	1
北九州総合病院	1
合計	53

(2) 最終診断

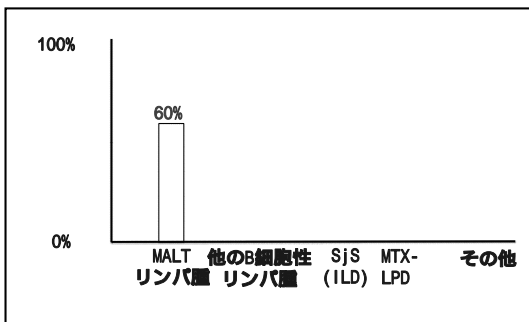
2018年3月の時点で53例の症例を集積した。そのうち、3例は最終診断が困難なため除外となった。現在も症例集積は継続しているが、現時点での結果報告を行う。

疾患	症例数
B細胞性リンパ腫	15
(MALT)	11

(びまん性大細胞性)	2
(リンパ系形質細胞性)	1
(濾胞性)	1
シェーグレン症候群	4
メトトレキサート関連リンパ増殖性疾患	4
その他の疾患	27
除外	3
合計	53

(3) 疾患別の *MALT1* 遺伝子転座陽性率

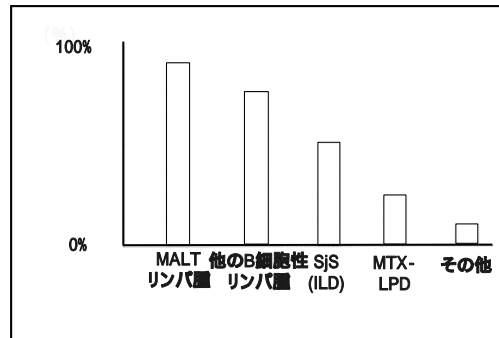
肺 MALT リンパ腫においては、陽性率 60% であり、また、その他の疾患では陽性率 0% であり、*MALT1* 遺伝子転座の BALF を用いた検出は肺 MALT リンパ腫診断に感度が比較的高く、また極めて特異性が高い手法であることが示唆された。



(4) 疾患別の IgH 再構成陽性率

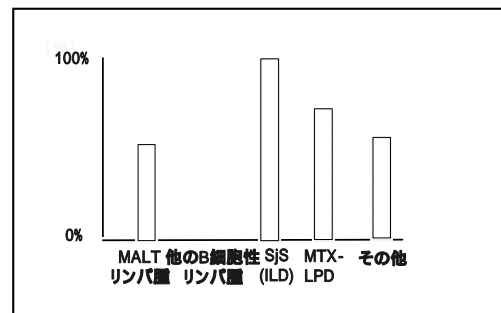
MALT リンパ腫やその他のB細胞性のリンパ腫診断においても感度は 75-90%程度と非常

に高いことが示された。シェーグレン症候群 (SjS) に伴う間質性肺炎や MTX 関連のリンパ増殖性疾患で陽性になることもあるが、非常に有用な検査である事が示された。



(5) 疾患別の TRB 再構成陽性率

TRB の再構成は、肺リンパ腫以外の疾患においても陽性率が高く、非特異性が高いと考えられた。



(6) まとめ

以上より、気管支肺胞洗浄液を用いた *MALT1* 遺伝子転座および IgH の再構成の同時検出は、肺リンパ腫診断に有用であることが示された。特に、*MALT1* 遺伝子転座は MALT リンパ腫に非常に感度、特異性が高いこと、IgH の再構成においては、MALT リンパ腫をはじめ

としたB細胞性リンパ腫のスクリーニングに非常に有用と考えられた。一方で、TRB の再構成はリンパ腫に対しての特異性は低く、診断への貢献は難しいことが示唆された。

〔学会発表〕(計 6 件)

城戸貴志、迎寛、矢寺和博、他．気管支肺胞洗浄液を用いた肺リンパ腫の分子生物学的診断手法の有効性 第 58 回日本呼吸器学会学術集会．2018/4/28．大阪国際会議場（大阪府・大阪市）．

T Kido, H Mukae, K Yatera, et al. The utility of the analyses of BALF by molecular biological method for the diagnosis of pulmonary lymphomas. ATS 2017 International Conference. 2017/05/23. Washington Convention Center (Washington, USA).

城戸貴志、迎寛、矢寺和博、他．気管支肺胞洗浄液を用いた肺リンパ腫の分子生物学的診断手法の確立 第 57 回日本呼吸器学会学術集会．2017/4/23．東京国際フォーラム（東京都・千代田区）．

城戸貴志、迎寛、矢寺和博、他．気管支肺胞洗浄液を用いた肺リンパ腫の分子生物学的診断手法の確立 第 57 回日本肺癌学会学術集会．2016/12/20．福岡国際会

議場（福岡県・福岡市）．

城戸貴志、迎寛、矢寺和博、他．気管支肺胞洗浄液を用いた肺リンパ腫の分子生物学的診断手法の確立 第 77 回日本呼吸器学会・日本結核病学会・日本サルコイドーシス学会・日本肉芽腫疾患学会．2016/07/22．萃香園ホテル（福岡県・久留米市）．

原 可奈子、城戸 貴志、迎寛、他．BAL 液の MALT1 遺伝子転座の検出が肺病変を有する MALT リンパ腫の診断に有用であった 2 例．第 56 回日本肺癌学会九州学術集会・第 39 回日本呼吸器内視鏡学会九州支部総会．2016/02/26．北九州国際会議場（福岡県・北九州市）．

6．研究組織

(1)研究代表者

城戸 貴志（KIDO, Takashi）
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30389465

(2)研究分担者

矢寺 和博（YATERA, Kazuhiro）
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：40341515

迎 寛 (MUKAE, Hiroshi)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：80253821